

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-29084
(P2001-29084A)

(43) 公開日 平成13年2月6日 (2001.2.6)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テームコード* (参考) |
|---------------------------|-------|----------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 14/705 | | C 0 7 K 14/705 | 4 B 0 6 3 |
| 16/28 | | 16/28 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 1/15 | | C 1 2 N 1/15 | 4 H 0 4 5 |
| 1/19 | | 1/19 | |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-209919

(22) 出願日 平成11年7月23日 (1999.7.23)

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 高崎 淳

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 松本 光之

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(74) 代理人 100089200

弁理士 長井 省三 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なG蛋白質共役型レセプター及び該G蛋白質共役型レセプター遺伝子

(57) 【要約】

【課題】創薬標的分子としての可能性が非常に高い、新規G蛋白質共役型レセプターファミリーをコードする遺伝子を単離・同定し、それらの活性を修飾する物質を探索するために必要となる組換え蛋白の提供。

【解決手段】炎症・免疫系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、該G蛋白質共役型レセプターファミリーを発現させた。該レセプターの遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同G蛋白質共役型レセプターファミリーの製造法、及び、該G蛋白質共役型レセプターファミリー及び該G蛋白質共役型レセプターファミリーを修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号2記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター、あるいは、該レセプターの同効物であるG蛋白質共役型レセプター。

【請求項2】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプターのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項3】請求項2記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項4】請求項3記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項5】請求項4記載の宿主細胞を用いる請求の範囲1記載のG蛋白質共役型レセプターの製造方法。

【請求項6】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプターに対する抗体。

【請求項7】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプターと被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、遺伝子工学の分野に属し、新規G蛋白質共役型レセプター、該G蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子、該G蛋白質共役型レセプターの製造方法、該G蛋白質共役型レセプターに対する抗体、該G蛋白質共役型レセプターを用いたスクリーニング法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】医学的に重要な生物学的プロセスの多くが、G蛋白質を含めたシグナル伝達経路に関与している。蛋白質及び またはセカンドメッセンジャーにより媒介されることはよく知られている (Lefkowitz, *Nature*, 1991, 351:353-354)。その中でも三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は「G蛋白質共役型レセプター」と総称されている。こうした蛋白質の例として、アドレナリンやドーパミンの受容体(Kobilka, B.K.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K.ら, *Science*, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R.ら, *Nature*, 1988, 336:783-787)などがある。現在まで知られている全てのG蛋白質共役型レセプターはアミノ末端を細胞外、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。G蛋白質共役型レセプターは様々な生理活性物質の情報を、三量体型GTP結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型GTP結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介するcAMP、フォスホリパーゼCを介するCa²⁺などがよく知られているが、三量体型GTP結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (Gudermann,

T. et al. (1997) *Annu. Rev. Neurosci.*, 20, 399-427)。G蛋白質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、ケモカイン、脂質由来の情報伝達物質、2価イオン、プロテアーゼなど既存の生理活性物質の多くが含まれる。これら生理活性物質にはそれぞれ特異的なG蛋白質共役型レセプターが存在し、その情報を細胞内に伝達する。

【0003】G蛋白質共役型レセプターはそのスーパーファミリー内での構造類似性から遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターはオーファンG蛋白質共役型レセプターと呼ばれている。一般的にオーファンG蛋白質共役型レセプターは特異的なリガンドが発見されていないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングを組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている (Stadel, J. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, 18, 430-437)。すなわち、多くのG蛋白質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっているcAMP、Ca²⁺の測定、或いは、三量体型GTP結合蛋白質の活性化の指標となるGTPase活性、GTPγSのG蛋白質結合測定などをハイスループット化することで化合物ライブラリーからオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患の治療ターゲットとなり得る新規G蛋白質共役型レセプターの発見が、G蛋白質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

【0004】現在までに数百種類のG蛋白質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたG蛋白質共役型レセプターがクローニングされている。これまでにそれらの受容体をターゲットとする数百種類もの疾患治療薬が利用されている (Wilson, J. et al. (1998) *British J. of Pharmacol.* 125, 1387-1392)。G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、泌尿器生殖器系それぞれの分野でG蛋白質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する (Stadel, J. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, 18, 430-437)。このことはG蛋白質共役型レセプターのアゴニスト或いはアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、各種疾患を予防、改善、治療する上で重要な役割を果たすと考えられる新たな受容体を同定し、疾患との関わりを解明する必要がある。

【0005】この中で、G蛋白質共役型レセプターは炎

症免疫系において重要な役割を果たしている。炎症、免疫反応は生体への異物の進入や組織障害から自身を防御する為の有益な働きをしているが、一方で、その過剰な反応や異常な反応が炎症性疾患や自己免疫疾患などの原因ともなる (Gallin, J. I. et al. (1992) *Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates* Raven Press (New York), Roitt, I. M. et al. (1993) *IMMUNOLOGY* Mosby-Year Book Europe Limited. (London))。これらの炎症免疫反応を惹起する物質の多くはメディエーターと呼ばれている。メディエーターのなかでもプロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子、ケモカイン、ブラジキニン、アナフィラトキシンなどのG蛋白質共役型レセプターを介して働くものの多くが炎症、免疫の異常に起因する疾患 (例えば、喘息、アレルギー、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、感染症など) の治療ターゲットとして考えられている (Halushka, P. V. et al. (1989) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 213-239, Hosford, D. et al. (1990) *Prog. Med. Chem.* 27, 325-380, Oppenheim, J. J. et al. (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9, 617-648)。免疫、炎症反応を司る白血球の機能は、ケモカイン、アナフィラトキシン、PAFやエイコサノイドなどの脂質代謝物、などの受容体であるG蛋白質共役型レセプターによって制御されている。また、白血球の産生するPAFやエイコサノイドなどの脂質代謝物は白血球周囲の組織の受容体を介して修飾を受ける (麻生芳郎 訳、一目でわかる免疫学(1993)、メディカル・サイエンス・インターナショナル発行、62-73, Proost, P. et al. (1996) *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26, 211-23, Scott, D. T. et al. (1994) *Gen. Pharmacol.* 25, 1285-96)。このようなことから、ケモカイン、アナフィラトキシン、PAFやエイコサノイドのG蛋白質共役型レセプターは免疫、炎症の異常に起因する疾患の治療ターゲットであると考えられている。しかしながら、免疫炎症の異常に起因する疾患 (これらに限らない) に関与するG蛋白質共役型レセプターとそれに関与する分子について全てが理解されたわけではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患、特に免疫炎症系の疾患 (気管支炎、アレルギー) の予防・治療剤の開発に必要な、新規なG蛋白質共役型レセプターファミリーをコードする遺伝子を単離・同定し、該レセプターの発現生産系の構築、該レセプター活性を修飾する物質を探索する為の組み換え蛋白を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】このような状況下、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、免疫炎症に関与する部位に発現している新規G蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子を単離することに成功し、その全長ORF (open reading frame) を決定した。さらに、新規G蛋白質

共役型レセプターを発現させ、組み換え蛋白の生産を可能にし、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いたG蛋白質共役型レセプター、該G蛋白質共役型レセプターに対する抗体の製造法を確立した。これにより、該G蛋白質共役型レセプター及び該G蛋白質共役型レセプター活性を修飾する物質のスクリーニングを可能にし、本発明を完成した。

【0008】即ち本発明は、(1) 配列番号2記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター、あるいは、該レセプターの同効物であるG蛋白質共役型レセプター、(2) (1) 記載のG蛋白質共役型レセプターのアミノ酸配列をコードする遺伝子、(3) (2) 記載の遺伝子を含むベクター、(4) (3) 記載のベクターを含む宿主細胞、(5) (4) 記載の宿主細胞を用いる(1)に記載のG蛋白質共役型レセプターの製造方法、(6) (1) 記載のG蛋白質共役型レセプターに対する抗体、(7) (1)に記載のG蛋白質共役型レセプターと被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質をスクリーニングする方法、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明で使用する用語につき説明する。本明細書中で使用される「G蛋白質共役型レセプター」は「G蛋白質共役型レセプター蛋白」を表す。本発明のG蛋白質共役型レセプターの「同効物」とは、配列番号2記載のアミノ酸配列中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至数個のアミノ酸残基が置換、失欠、及び/または挿入されていてもよく、かつG蛋白質共役型レセプターと同一の活性を示すG蛋白質共役型レセプターをいう。好ましくは配列番号2記載のアミノ酸配列において1乃至10個、更に好ましくは1乃至7個、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号2記載のアミノ酸配列で示される蛋白と同一の活性を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白であり、配列番号2記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドが最適である。

【0010】また、本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白をコードする塩基配列を有する遺伝子は、配列番号2記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白、あるいは、それらの同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子なら何れでもよい。好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号1記載の塩基配列の1番から1077番を有する遺伝子である。

【0011】(製造法) 本発明のG蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のG蛋白質共役型レセプター、本発明のG蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質のス

クリーニング方法、G蛋白質共役型レセプターに反応する抗体の製造方法は、以下1)～4)に記載する。

1) 新規G蛋白質共役型レセプター遺伝子の製造方法

a) 第1製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプターを産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAを鋳型として該G蛋白質共役型レセプターmRNAまたは一部のmRNA領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号2で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白質に適した逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(以下RT-PCRという)を行うことにより、該G蛋白質共役型レセプターcDNAまたはその一部を得ることができる。さらに、得られたG蛋白質共役型レセプターcDNAまたはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該レセプターを製造することができる。

【0012】まず、本発明のG蛋白質共役型レセプターの産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト胎盤から該レセプターをコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該レセプターの産生能力を有する細胞あるいは組織は、該レセプターをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザン・ブロットリング法、該レセプターに特異的な抗体を用いたウェスタン・ブロットリング法などにより特定することができる。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする新規G蛋白質共役型レセプターDNAを増幅する。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

【0013】b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstrati-

adis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5 α 株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557-580)、すなわちCaCl₂やMgCl₂またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

【0014】上記により得られる形質転換株から、目的の新規G蛋白質共役型レセプターのDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプターの全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(³²P又は³³Pで標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を³²P又は³³Pで標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

【0015】③ 他の動物細胞で新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させてスクリーニングする方法、形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を

動物細胞にトランスフェクトし(この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを有する株を選択する。

④ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。得られた目的の形質転換株より本発明のG蛋白質共役型レセプターをコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

【0016】c) 第3製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機(例えば、Oligo 1000 M DNA Synthesizer(Beckman社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer(Applied Biosystems社)など)を用いて合成することができる。

【0017】d) 第4製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子は、G蛋白質共役型レセプターの情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al. (1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, r43-r74)。さらに、これら塩基配列の

コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。以上、a)乃至d)により得られるDNAの配列決定は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980): "Methods in Enzymology" 65, 499-559)やM13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene, 19, 269-276)等により行うことができる。

【0018】2) 本発明のG蛋白質共役型レセプターの組み換え蛋白質の製造方法

単離された本発明のG蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組み込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpsteinBarr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞(Invitrogen社)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell Biol., 1, 854-864)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社)等を例示できるが、これに限定されない。

【0019】宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med. Immunol., 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM

S(Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842)等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(Boehringer Mannheim社)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) EMBO J., 1, 841-845)等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規G蛋白質共役型レセプターを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCPEP4(Invitrogen社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

【0020】上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明のG蛋白質共役型レセプターが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明のG蛋白質共役型レセプターは、該レセプターの物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該レセプターを含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のG蛋白質共役型レセプターを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキ

トニン等)でG蛋白質共役型レセプター蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もレセプターの特性を保持することができる。

【0021】本発明のG蛋白質共役型レセプターはマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とHexa-Histidine tagとをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Hag, a, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)。

【0022】3) 本発明のG蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質(化合物、ペプチド及び抗体)のスクリーニング方法

本発明のスクリーニング法は、前記により構築されたG蛋白質共役型レセプターを用いて、該G蛋白質共役型レセプターの生理学的な特性に応じたG蛋白質共役型レセプターの修飾の指標を測定する系に被験物質を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法a)~d)が挙げられる。また、被験物質は従来G蛋白質共役型レセプターリガンド活性を有することは知られているが該新規G蛋白質共役型レセプターの活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のG蛋白質共役型レセプターリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やフェージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

【0023】a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプターに結合する化合物、ペプチド及び抗体(総称してリガンド)はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該レセプターを発現させた細胞膜、あるいは該レセプター精製標品を調製し、リガンド結合アッセイ用に精製されたリガンドを放射性標識(50-2000 Ci/mmol)する。緩衝

液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同レセプターを発現させた細胞膜、あるいは該レセプター精製標品を放射性標識したリガンドと共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する(全結合量)。放射性標識していないリガンドを上記反応液中に大過剰加えることにより非特異的結合量を測定し、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量がえられる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品に対して特異的結合を示したリガンドを本発明のG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドとして選択することができる。また、得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該G蛋白質共役型レセプターのアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

【0001】b) GTPγS結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質はGTPγS結合法によりスクリーニングすることが可能である(Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) *Br. J. Pharmacol.* 109, 1120-1127)。該レセプターを発現させた細胞膜を20 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、50 mM GDP溶液中で、³²Sで標識されたGTPγS 400 pMと混合する。被検物質存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合したGTPγSの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被検物質存在下における特異的なGTPγS結合の上昇を指標に、該G蛋白質共役型レセプターのアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体によるGTPγS結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプターのアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

【0002】c) 細胞内Ca²⁺およびcAMP濃度の変動を利用したスクリーニング方法

多くのG蛋白質共役型レセプターはアゴニスト刺激で細胞内のCa²⁺の上昇および/またはcAMP濃度の上昇または低下を引き起こす。ゆえに本発明のG蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質は細胞内Ca²⁺またはcAMP濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。Ca²⁺濃度の測定はfura2等を用い、cAMP濃度の測定は市販のcAMP測定キット(Amersham社等)を用いて測定する。また、Ca²⁺およびcAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより間接的にCa²⁺およびcAMP濃度を測定することが可能である。該レセプターを発現させた細胞とレセプターを発現させてい

ない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、Ca²⁺およびcAMP濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプターを発現させた細胞特異的なCa²⁺の上昇および/またはcAMP濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体によるCa²⁺の上昇および/またはcAMP濃度の上昇または低下を指標に該G蛋白質共役型レセプターのアントゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

【0006】d) マイクロフィジオメーターを用いたスクリーニング方法

細胞が様々なシグナル応答を行う場合、細胞外への微少な水素イオンの流出が検出される。この水素イオンの流出は、その大部分が、細胞が応答するためのエネルギーを得るための燃料消費で生ずる代謝産物の増加、または細胞のシグナルが直接水素イオンポンプに伝達する場合に生ずる。本発明のG蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達にエネルギーを必要とするため、レセプターの活性化の際には水素イオンの流出が起こる。CYTOSE NSORマイクロフィジオメーター(Molecular Devices社)により、このような細胞近傍の培地中の微少な水素イオンの流出によるpH変化が検出可能であることから、このようなエネルギーを消費する受容体の活性化の検出に利用できる。該レセプターを発現させた細胞とレセプターを発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、水素イオンの流出によるpH変化を測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプターを発現させた細胞特異的な水素イオンの流出によるpH変化を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出によるpH変化を指標に該G蛋白質共役型レセプターのアントゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

【0007】4) 本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体の作成方法

本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該新規G蛋白質共役型レセプターや該G蛋白質共役型レセプターの断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明G蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いてDNAワクチン法(Raz, E. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) *J. Infect. Dis.*, 173, 314-320)によっても得ることができる。ポリクローナル抗体は該G蛋白質共役型レセ

ブターまたはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵からポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

【0028】モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C. (1975) *Nature*, 256, 495-497) により当業者が容易に製造することが可能である。すなわち、本発明G蛋白質共役型レセプターまたはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返して接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8. U1. を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株はHAT選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で2~4日間、あるいはプリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10~20日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。また、モノクローナル抗体またはその一部分を含む抗体断片は該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。

【0029】以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パバイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fvを得るこ

とができる。さらには、本発明G蛋白質共役型レセプターに反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3175-3179) によりsingle chain FvやFabとして得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al. (1994) *Nature*, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

【0030】本発明には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または前記スクリーニング法により選択されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を有意に修飾する物質を有効成分とする医薬が包含される。本発明のG蛋白質共役型レセプター活性修飾化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあつては静注等の非経口投与が望まれる。

【0031】本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。投与量は

前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

【0032】

【実施例】以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

(実施例1) 新規G蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子の単離

本発明のG蛋白質共役型レセプター (HORK2) をコードする全長cDNAは、ヒト胎盤由来のpoly A⁺ RNA (Clontech社製) をtemplateとしてRT-PCRにより取得した。配列番号3で示されるオリゴヌクレオチドをforward primerとして、配列番号4で示されるオリゴヌクレオチドをreverse primerとして用いた (それぞれの5'末端にはXbaI siteが付加してある)。RT-PCRはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を用い5% DMSO存在下で98℃ (10秒) / 58℃ (30秒) / 72℃ (2分) のサイクルを34回繰り返した。その結果、約1.1 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をXbaIで消化した後、pEF-BOS plasmid (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社製) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号1に示す。配列番号1で示される塩基配列は1077 baseのORFを持っている。ORFから予測されるアミノ酸配列 (358アミノ酸) を配列番号2に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。本遺伝子がコードするG蛋白質共役型レセプターをHORK2と名付けた。新規G蛋白質共役型レセプターHORK2はリガンドと対応のとれている公知のG蛋白質共役型レセプターファミリーとのホモロジーはそれぞれアミノ酸配列で30%以下であった。

【0033】 (実施例2) 組織におけるヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子の発現分布

RT-PCR法により本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子の発現分布を解析した。ヒトの各臓器 (脳 (扁桃核、尾状核、海馬、脳梁、黒質、小脳)、脊髄、下垂体、心臓、胎盤、肺、気管、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、胃、脾臓、骨髄、胸腺、甲状腺、唾液腺、副腎、乳腺、前立腺、精巣、卵巣) 由来のpoly A⁺ RNA (5 mg) (Clontech社製) をDNase (Nippon Gene社製) を用い37℃で15分反応させた。DNase処理したpoly A⁺ RNAのうち4 mgからMLV Reverse Transcriptase (Clontech社製) で42

℃で60分、94℃で5分順次反応させ、cDNAを合成した。合成されたcDNAは800 mlの滅菌水に溶解した。HORK2の発現分布は上記のヒトの各臓器のcDNAを鋳型として、primerセットは配列番号5で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号6で示されるオリゴヌクレオチドを用いた。PCRはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を用い5% DMSO存在下で98℃ (10秒) / 56℃ (30秒) / 72℃ (1分) のサイクルを30回繰り返した。また、内部標準としては上記のヒトの各臓器のcDNAを鋳型として、Human GAPDH Control Amplimer Set (Clontech社製) を用いて、同条件のPCRを行った。反応産物は1%アガロースゲルにて電気泳動して解析した (図1)。HORK2の約400bpの増幅産物は胎盤と気管のみで検出された。以上の結果より、HORK2は喘息等の炎症に関与する部位 (気管) に発現していることが分かった。

【0034】 (実施例3) 新規G蛋白質共役型レセプターファミリーの発現の確認

ヒトHORK2を発現させるための発現ベクターとしてpEF-BOSを用いた。そのとき、ヒトHORK2のN末端にマーカー配列としてFLAG epitopeを融合するために、HORK2の蛋白質コーディング配列の5'末端に配列番号7で示されるオリゴヌクレオチドを挿入した。このように構築したプラスミドはそれぞれ、pEFBOS-FL-HORK2とした。このプラスミドを用いることで、ヒトHORK2のポリペプチドのN末端に配列番号8で示されるポリペプチドが融合した発現した。10cmシャーレに293-EBNA (Invitrogen社製) を1x10⁶細胞で播種して1日培養後、8 mgのpEF-BOS-FL-HORK2およびpEF-BOS-FL (空ベクター) をFuGENE6 (Boehringer Mannheim社製) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、一日培養した細胞を回収、洗浄後、1% BSA/PBSに懸濁した。これを氷温遮光下におき、5x10⁶細胞毎に1次抗体として最終濃度2mg/mlとなるようにマウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社製) または通常マウスIgG (Zymed社製) を添加、1時間インキュベートした。PBS洗浄後、さらに2次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウスIgG (Biosource社製) を200倍希釈になるように加え、氷温遮光下で1時間インキュベートした。蛍光強度の測定はEPICS = XL-MCL (Coulter社製) で行った (図2)。図2は10,000個の細胞を測定した結果を示しており、縦軸が細胞数、横軸が蛍光強度を表す。HORK2導入細胞に対して1次抗体にM2を用いた場合のみ、FITC蛍光強度上昇方向にシフトしていることから、FLAGエピトープを含むHORK2が細胞膜表面上に発現していることが確認できた。

【0035】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプターは免疫炎症系疾患 (特に、気管支炎、アレルギー) の予防・治療剤のスクリーニングツールとして有用である。具体的には、本発明のG蛋白質共役型レセプターと被験物質を接触させることにより、該G蛋白質共役型レセプターの活性を修飾する物質 (化合物、ペプチド及び抗体) をスク

リーニングし、新たな医薬、特に、いまだ完全にコントロールすることができない免疫炎症系疾患の予防・治療剤をスクリーニングすることを意味する。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターをコードする遺伝子またはレセプターに対する抗体は、該遺伝子の変異、または、発現異常により生じうる疾患の罹患性の診断のためのツールとしての有用である。

SEQUENCE LISTING

<:110>: Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<:120>: 新規なG蛋白質共役型レセプター及び該G蛋白質共役型レセプター遺伝子

<:130>: 0000002899

<:140>:

<:141>:

<:160>: 8

<:170>: PatentIn Ver. 2.0

<:210>: 1

<:211>: 1077

<:212>: DNA

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 1

```
atggggllca acttgacget tgcaaaatta ccaataacg agctgcacgg ccaagagagt 60
cacaallcag gcaacaggag cgacgggcca ggaaagaaca ccacccttca caatgaattt 120
gacacaattg tcttgcgggt gctttatctc attatatttg tggcaagcat cttgctgaat 180
gattttgcag tgttgatctt ctccacatt aggaataaaa ccagcttcat attctatctc 240
aaaaacatag tggtlgcaga cctcataatg acctgacat ttccatttcg aatagtccat 300
galgcaggat ttggaccttg gtacttcaag ttattctctc gcagatacac ttcagttttg 360
llllalgcag acatgtatac ttccatcgtg ttccttgggc tgataagcat tgatcgetat 420
ctgaaggtgg tcaagccatt tggggactct cggatgtaca gcataacctt cacgaaggtt 480
llatctglll ggttllgggt gatcatgget gttllgtctt tgccaaacat catcctgaca 540
aalggllcag caacagagga caatatecat gactgtcaa aacttaaaag tcctttgggg 600
gtcaaatgag atacggcagt cacttatgtg aacagctgct tgtttgtgac cgtgctggtg 660
attctgacg gatgttcat agccatatcc aggtacatcc acaaatccag caggcaattc 720
ataagtcagt caagccgaaa gcgaaaacat aaccagagca tcagggttgt tgggctgtg 780
ttttttacct gctttctacc atatcacttg tgcagaatc cttttacttt tagtcactta 840
gacagsettt tagatgaac tgcacaaaaa atcctatatt actgcaaaga aattacactt 900
ttctllgtc gtlglaatgt ttgcttgat ccaataattt actttttcat gtgtaggtca 960
ttttcaagaa ggetgttcaa aaaatcaaat atcagaacca ggagtgaag catcagatca 1020
ctgcaaatg tgagaagatc ggaagttcgc atatattatg attacactga tgtgtag 1077
```

<:210>: 2

<:211>: 358

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 2

Met Gly Phe Asn Leu Thr Leu Ala Lys Leu Pro Asn Asn Glu Leu His

1 5 10 15

Gly Gln Glu Ser His Asn Ser Gly Asn Arg Ser Asp Gly Pro Gly Lys

20 25 30

Asn Thr Thr Leu His Asn Glu Phe Asp Thr Ile Val Leu Pro Val Leu

35 40 45

【0036】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、HORK2のヒト臓器についての発現分布の解析の結果を示す。

【図2】図2は、HORK2の発現を確認した結果を示す。

【配列表】

Tyr Leu Ile Ile Phe Val Ala Ser Ile Leu Leu Asn Gly Leu Ala Val
 50 55 60
 Trp Ile Phe Phe His Ile Arg Asn Lys Thr Ser Phe Ile Phe Tyr Leu
 65 70 75 80
 Lys Asn Ile Val Val Ala Asp Leu Ile Met Thr Leu Thr Phe Pro Phe
 85 90 95
 Arg Ile Val His Asp Ala Gly Phe Gly Pro Trp Tyr Phe Lys Phe Ile
 100 105 110
 Leu Cys Arg Tyr Thr Ser Val Leu Phe Tyr Ala Asn Met Tyr Thr Ser
 115 120 125
 Ile Val Phe Leu Gly Leu Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Lys Val Val
 130 135 140
 Lys Pro Phe Gly Asp Ser Arg Met Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Lys Val
 145 150 155 160
 Leu Ser Val Cys Val Trp Val Ile Met Ala Val Leu Ser Leu Pro Asn
 165 170 175
 Ile Ile Leu Thr Asn Gly Gln Pro Thr Glu Asp Asn Ile His Asp Cys
 180 185 190
 Ser Lys Leu Lys Ser Pro Leu Gly Val Lys Trp His Thr Ala Val Thr
 195 200 205
 Tyr Val Asn Ser Cys Leu Phe Val Ala Val Leu Val Ile Leu Ile Gly
 210 215 220
 Cys Tyr Ile Ala Ile Ser Arg Tyr Ile His Lys Ser Ser Arg Gln Phe
 225 230 235 240
 Ile Ser Gln Ser Ser Arg Lys Arg Lys His Asn Gln Ser Ile Arg Val
 245 250 255
 Val Val Ala Val Phe Phe Thr Cys Phe Leu Pro Tyr His Leu Cys Arg
 260 265 270
 Ile Pro Phe Thr Phe Ser His Leu Asp Arg Leu Leu Asp Glu Ser Ala
 275 280 285
 Gln Lys Ile Leu Tyr Tyr Cys Lys Glu Ile Thr Leu Phe Leu Ser Ala
 290 295 300
 Cys Asn Val Cys Leu Asp Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Met Cys Arg Ser
 305 310 315 320
 Phe Ser Arg Arg Leu Phe Lys Lys Ser Asn Ile Arg Thr Arg Ser Glu
 325 330 335
 Ser Ile Arg Ser Leu Gln Ser Val Arg Arg Ser Glu Val Arg Ile Tyr
 340 345 350
 Tyr Asp Tyr Thr Asp Val
 355

<:210>: 3

<:211>: 33

<:212>: DNA

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 3

gggclagaa tggggttcaa cttagcgtt gca

33

<:210>: 4

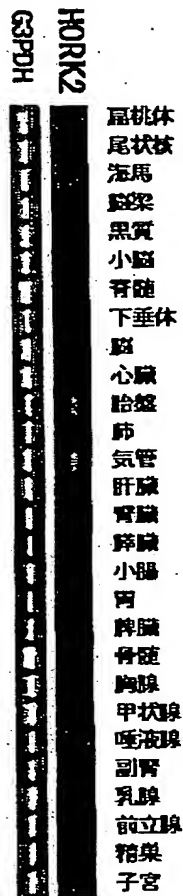
<:211>: 35

<:212>: DNA

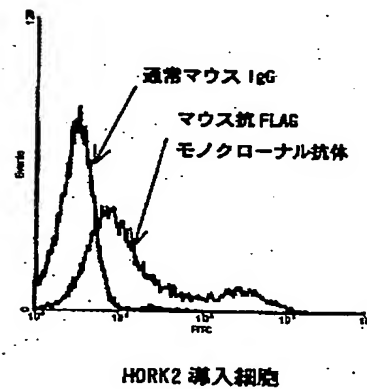
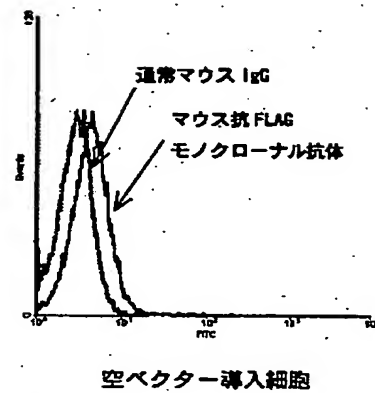
<:213>: Homo sapiens

<;400>: 4
ccctctagac tacacatcag tgtaatcata atata 35
<;210>: 5
<;211>: 34
<;212>: DNA
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 5
agtgcacac aactgaagaa tggsgttcaa ctg 34
<;210>: 6
<;211>: 25
<;212>: DNA
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 6
atcagcccaa ggaacacgat ggaag 25
<;210>: 7
<;211>: 36
<;212>: DNA
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 7
atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg 36
<;210>: 8
<;211>: 12
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 8
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu
1 5 10

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

C 1 2 N 1/21
5/10
C 1 2 Q 1/00

F I

C 1 2 N 1/21
C 1 2 Q 1/00
C 1 2 N 5/00

テーム (参考)

Z
A

(72) 発明者 杉本 貴

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内

(72) 発明者 蒲原 正純

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内

(72) 発明者 斎藤 哲

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内

F ターム (参考) 4B024 BA63 CA04 DA02 DA03 EA04
GA11

4B063 QA01 QA18 QQ20 QRS0 QX01
QX07

4B065 AA26X AA90X AA91X AA93X
AA93Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA46

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA50
DA75 EA50 FA72 FA74

THIS PAGE BLANK (USPTO)